

ARTIKEL PENELITIAN

Karakteristik *Reverse Transcriptase* Gen *Polymerase* Virus Hepatitis B Pada Penderita Hepatitis B Kronis Asimptomatik Pra-Pengobatan

Turyadi,^{1,4} Meta D. Thedja,^{1*} Susan Irawati Ie,¹ Vanny Narita,²
Neni Nurainy,³ David H. Muljono^{1,4,5}

¹Lembaga Biologi Molekuler Eijkman²
Universitas Al Azhar Indonesia

³PT Biofarma Persero⁴

Universitas Hasanuddin

⁵Sydney University

*Corresponding author: meta@eijkman.go.id

Diterima 27 Juli 2017; Disetujui 19 Desember 2017

DOI: 10.23886/ejki.5.8046

Abstrak

Antiviral nucleos(t)ide analogue (NUCs) merupakan pengobatan utama pada hepatitis B kronis (HBK). Pemberian jangka panjang dinilai cukup efektif menekan progresivitas penyakit, namun dapat menimbulkan mutasi resisten. Studi ini melihat karakteristik gen polimerase yang berkaitan dengan resistensi NUCs pada penderita HBK asimptomatik pra-pengobatan. Penelitian dilakukan di Laboratorium Hepatitis, Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta. Sebanyak 38 sampel individu dengan hepatitis B surface antigen (HBsAg) positif dikarakterisasi dengan PCR-sekuensing. Genotipe dan sub tipe ditentukan berdasarkan sekuens HBsAg. Sebanyak 37 (97,4%) sampel menunjukkan mutasi rtQ238H/N dan satu sampel wildtype. Sebanyak 23 (62,2%) memiliki mutasi rtQ238H, 10 (27,0%) rtQ238N, dan empat (10,8%) dengan mutasi ganda rtA194T dan rtQ238H. Genotipe B ditemukan pada 26 (68,4%) sampel, genotipe C pada 11 (28,9%), dan genotipe D pada satu (2,6%) sampel. Secara statistik, mutasi rtQ238H berasosiasi dengan genotipe B ($p<0,001$) dan mutasi rtQ238N dengan genotipe C ($p<0,001$). Sub tipe ayw ditemukan pada 25 (65,8%) sampel, adr pada 11 (28,9%), dan adw pada dua (5,3%) sampel. Sebagian besar sampel tidak menunjukkan mutasi yang berkaitan dengan resistensi NUCs, sehingga pemberian NUCs masih. Mutasi rtQ238H merupakan varian yang berkaitan dengan genotipe B dan rtQ238N dengan genotipe C.

Kata kunci: virus hepatitis B; mutasi; pengobatan; polimerase.

Reverse-Transcriptase Characteristics of Hepatitis B Virus Polymerase Gene in Treatment-Naïve Asymptomatic Chronic Hepatitis B Individuals

Abstract

Nucleos(t)ide analogues (NUCs) remain the main treatment for chronic hepatitis B (CHB). Long-term use of NUCs significantly reduces disease progression; however, it might lead to resistance-associated mutations. We studied characteristics of polymerase gene related to NUCs resistance in naïve hepatitis B surface antigen (HBsAg)-positive individuals. The research was done at Laboratory of Hepatitis, Eijkman Institute, Jakarta. Thirty eight samples were obtained and submitted for HBV DNA detection. Identification of mutations was performed by PCR-sequencing, and analyzed to obtain NUCs resistance motifs. Genotype and subtype were determined based on HBsAg sequence. Mutation of rtQ238H/N was found in 37 (97.4%) samples. Of those, 23 (62.2%) showed rtQ238H mutation, 10 (27.0%) had rtQ238N mutation, and four (10.8%) with double mutations of rtA194T and rtQ238H. Genotype B was found in 26 (68.4%), C in 11 (28.9%), and D in one (2.6%) samples. Statistically, the mutation variant of rtQ238H was associated with genotype B ($p<0.001$), while rtQ238N with C ($p<0.001$). The ayw subtype was found in 25 (65.8%), adr in 11 (28.9%), and adw in two (5.3%) samples. No mutation associated with NUCs resistance was found in most samples. This emphasizes that NUCs are still a prospective treatment in naïve CHB patients. Mutation of rtQ238H was a variant found to be significantly associated with HBV genotype B and rtQ238N with genotype C.

Key words: HBV, mutation, treatment-naïve, polymerase

Pendahuluan

Penyakit hepatitis B merupakan penyakit yang menyerang hati, disebabkan oleh infeksi virus hepatitis B (VHB) dan merupakan masalah kesehatan dunia terutama di negara berkembang. Berdasarkan status HBsAg, sekitar 257 juta penduduk dunia menderita infeksi kronis VHB. Pada tahun 2015 sebanyak 887 ribu orang meninggal dunia karena VHB yang sebagian besar mengalami komplikasi sirosis dan kanker hati.^{1,2} Berdasarkan hasil riset kesehatan dasar tahun 2007 didapatkan 9,4% penduduk mengidap infeksi VHB sehingga Indonesia termasuk negara dengan prevalensi hepatitis B yang tinggi.³⁻⁶

VHB merupakan virus DNA dengan genom sirkuler untai ganda parsial dan memiliki 4 *open reading frames* (ORFs) yang tumpang tindih membentuk genom kompak dan protein: ORF S (*surface*) menyandi hepatitis B *surface antigen* (HBsAg), ORF C (*core*) menyandi hepatitis B *core antigen* (HBcAg) dan hepatitis B e antigen (HBeAg), ORF P (polimerase) menyandi polimerase, dan ORF x menyandi hepatitis B x antigen (HBxAg).

Proses replikasi DNA VHB harus melalui proses transkripsi balik (*reverse transcription*) dari RNA *intermediate* (pgRNA) menjadi *relaxed circular DNA* (rcDNA) menggunakan enzim *reverse transcriptase* VHB. Karena tidak memiliki kemampuan *proof reading* pada enzim *reverse transcriptase*, proses transkripsi balik tersebut memicu terbentuknya variasi genetik pada genom VHB yang sifatnya dapat fatal bagi virus tetapi sebagian lagi tetap hidup dan beredar sebagai VHB mutan.⁷ Genom VHB yang kompak juga dapat meningkatkan terbentuknya variasi genetik. Tidak adanya mekanisme *proof reading* dan genom yang kompak ditambah laju replikasi yang tinggi dapat meningkatkan variasi genetik/mutasi genom VHB yang dapat mencapai frekuensi $1,4 \times 10^{-5} - 3,2 \times 10^{-5}$ nukleotida/hari.⁸⁻¹⁰

Interaksi VHB dengan sistem imun pejamu turut berperan dalam menimbulkan variasi genetik VHB sebagai respons virus untuk bertahan dari sistem imun pejamu termasuk pemberian obat.¹¹⁻¹⁶ Hingga kini pengobatan hepatitis B kronis meliputi obat nukleot(s)ida analog (NUCs) dan *pegylated-interferon alpha* (peg-IFN) yang dapat digunakan sendiri atau kombinasi keduanya. NUCs merupakan inhibitor kompetitif enzim *reverse transcriptase* sehingga dapat menekan replikasi VHB cukup efisien dan menurunkan jumlah VHB yang beredar di tubuh pejamu. Terdapat beberapa NUCs yang sudah digunakan yakni lamivudin (LAM), adefovir dipivoksil (ADV), entekavir monohidrat (ETV), telbivudin (LdT), dan tenofovir disoproksil fumarat (TDF) serta emtricitabin.

Pengobatan dengan NUCs jangka panjang dapat mengurangi jumlah virus sehingga dapat

menekan progresivitas penyakit.¹⁷ Pemberian ETV atau TDF hingga 5 tahun dapat menekan DNA VHB hingga tidak terdeteksi pada 94-98% kasus, serokonversi HBeAg pada 40-41% pasien dengan HBeAg positif, hilangnya HBsAg pada 3-10% kasus, dan penurunan ALT.¹⁸⁻²⁰ Pemberian secara oral, efek samping yang sedikit, respons yang cukup tinggi, serta biaya yang tidak terlalu tinggi menyebabkan NUCs menjadi pilihan. Meskipun demikian, penggunaan jangka waktu lama terutama NUCs yang memiliki *low genetic barrier* atau pemakaian *monotherapy* dapat menimbulkan resistensi NUCs, *long-term safety*, dan durasi pengobatan yang tidak terbatas untuk tetap menekan replikasi virus.⁵ Yapali et al²⁰ melaporkan bahwa risiko resistensi NUCs 1,2% untuk ETV dan 0% untuk TDF pada penggunaan lebih dari 5 tahun pada pasien yang belum mendapat pengobatan.

Pemberian NUCs jangka panjang menekan progresivitas penyakit pada pasien dengan *viral load* tinggi dan *reverse* fibrosis dan sirosis.²¹ Penggunaan kombinasi nukleosida dan nukleotida analog lebih direkomendasikan untuk mengatasi resistensi obat viral.^{5,6}

Variasi genetik pada gen *polymerase* terutama pada domain *reverse transcriptase* dapat menjadi hambatan pengobatan dengan NUCs. Dengan demikian informasi mengenai prevalensi mutasi di suatu wilayah akan bermanfaat dalam menentukan penanganan hepatitis B. Studi ini bertujuan mendapatkan data karakteristik gen polimerase DNA VHB pada pasien dengan infeksi VHB kronis asimtomatik yang belum mendapat pengobatan.

Metode

Subjek Penelitian

Subjek penelitian merupakan 38 individu dari kelompok populasi "sehat" dengan HBsAg positif tanpa gejala/asimtomatik yang berasal dari beberapa daerah di Indonesia dan belum mendapat pengobatan antiviral. Subjek setuju untuk ikut serta secara sukarela dalam penelitian ini dan menandatangani surat persetujuan setelah penjelasan. Penelitian dilakukan di Laboratorium Hepatitis, Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta. Semua protokol penelitian telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Lembaga Biologi Molekuler Eijkman (93/EIREC/2015).

DNA VHB didapat dari ekstraksi 140 µL serum masing-masing subjek penelitian menggunakan QIAamp DNA MiniKit (QIAGEN, CA, USA) dan dilarutkan menjadi 60 µL. Amplifikasi bagian gen polimerase VHB dilakukan dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik 006F (nt 56-75; 5'- CCT GCT GGT

GGC TCC AGT TC -3') sebagai primer *sense* and 995R (nt993–970; 5'-TTG ACA TAC TTT CCA ATC AAT AGG -3') sebagai primer *antisense*, yang mencakup ranah gen yang menyandi *reverse transcriptase* (rt) dari asam amino pertama rt1 sampai asam amino rt281. PCR dilakukan dalam volume 25 µL dengan komposisi 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 400nM masing-masing primer dan 1 unit enzim *taq polymerase* (Invitrogen, USA). Produk PCR positif dengan ukuran 939 pb dimurnikan menggunakan *PCR purification column* (QIAGEN, CA, USA) untuk dilakukan sekuensing dengan *DNA sequence analyzer* ABI 3130xl (Applied Biosystems, USA).

Analisis Karakteristik Gen Polimerase VHB

Sekuens DNA gen polimerase disejajarkan dengan sekuens VHB yang diperoleh dari GenBank (AN. M54923) sebagai acuan normal dan penomoran basa pada sekuens genom VHB dimulai dari situs pemotongan enzim restriksi *EcoRI*. Sekuens asam amino diperoleh dengan penterjemahan sekuens DNA setelah dilakukan pensejajaran yang dimulai dari ORF P, sedangkan penomoran asam amino rt dimulai dari asam amino 349 dari protein P sebagai rt1.²² Penentuan mutasi yang berkaitan dengan obat NUCs mengikuti panduan yang disusun untuk kawasan Asia Pasifik yakni mutasi rtM204V/I, rtL180M dan/atau rtA181V/T berkaitan dengan resistensi LAM; mutasi rtM204I dan/atau rtA181V/T berkaitan dengan resistensi LdT; mutasi rtA181V/T dan/atau rtN236T berkaitan dengan resistensi ADV; mutasi rtL180M, rtT184S/A/I/L/G/C/M, rtM204V dan/atau rtM250V berkaitan dengan resistensi ETV; dan mutasi rtA181T/V untuk resistensi TDF.^{2,23,24}

Penentuan Genotipe dan Subtipe VHB

Genotipe VHB ditentukan dengan analisis filogenetik berdasarkan urutan basa dari gen penyandi polimerase sepanjang 797 basa yang tumpang tindih dengan sekuens basa gen HBsAg. Analisis pohon filogenetik dilakukan bersama dengan 24 sekuens yang diperoleh dari GenBank dan telah diketahui masing-masing genotipenya, menggunakan peranti lunak MEGA 4.1 dengan parameter Kimura-2, *neighbor-joining*, dan nilai *bootstrap* 1000.^{25,26} Subtipe VHB ditentukan berdasarkan jenis asam amino pada posisi 122 dan 160 dari protein HBsAg.²⁷

Hasil

Mutasi pada Domain Reverse Transcriptase Gen Polimerase

Dari 38 subjek penelitian dengan infeksi VHB kronik asimtomatik, sebanyak 10 (26,3%) subjek berasal dari sisi barat dan 28 (73,7%) subjek dari daerah garis Wallacea dan sebagian kecil dari sisi timur Wallacea (Tabel 1). Semua sampel dari 38 subjek menunjukkan hasil positif deteksi gen polimerase DNA VHB berukuran 939 pb. Hasil pensejajaran sekuens domain *reverse transcriptase* gen polimerase yang berperan kritical dalam replikasi DNA VHB menggunakan sekuens daerah yang sama dari isolat AN. M54923 sebagai acuan normal/pembanding. Hasil analisis dengan melihat posisi tertentu yang terkait dengan resistensi NUCs menunjukkan variasi genetik yang mengakibatkan mutasi asam amino pada 37 (97,4%) sampel, sedangkan 1 sampel menunjukkan sekuens *wild type* (wt). Dari 37 sampel dengan mutasi, didapat 23 (62,2%) sampel dengan mutasi rtQ238H, 10 (27,0%) sampel dengan mutasi rtQ238N, dan 4 (10,8%) sampel (KD35, KDI04, KDI35, dan KDI43) dengan mutasi ganda rtA194T dan rtQ238H (Tabel 2).

Tabel 1. Mutasi dan Polimorfisme Domain Reverse Transcriptase Gen Polimerase yang Berkaitan dengan Resistensi Nukleos(T)ida Analog dan Genotipe

| Varian asam amino | Antiviral | | | | | Genotipe |
|----------------------------|-------------------|-----|-----|-------------------|-----|----------|
| | Nukleosida analog | | | Nukleotida analog | | |
| | LAM | LdT | ETV | ADV | TDF | |
| <i>Mutasi</i> | | | | | | |
| A181T/V | R | S | S | R | S | |
| L180M + M204V/I/S | R | R | I | I | S | |
| M204V/I | R | R | I | I | S | |
| N236T | S | S | S | R | I | |
| A181T/V + N236T | R | S | S | R | I | |
| L180M + M204V/I±T184 | R | R | R | S | S | |
| L180M + M204V/I±S202 | R | R | R | S | S | |
| L180M + M204V/I±I169T±M250 | R | R | R | S | S | |
| rtA194T | R | S | S | ? | I/R | |
| <i>Polimorfisme</i> | | | | | | |
| rtQ238H | | | | | B | |
| rtQ238N | | | | | C | |

Mutasi Q238H/N dan Genotipe

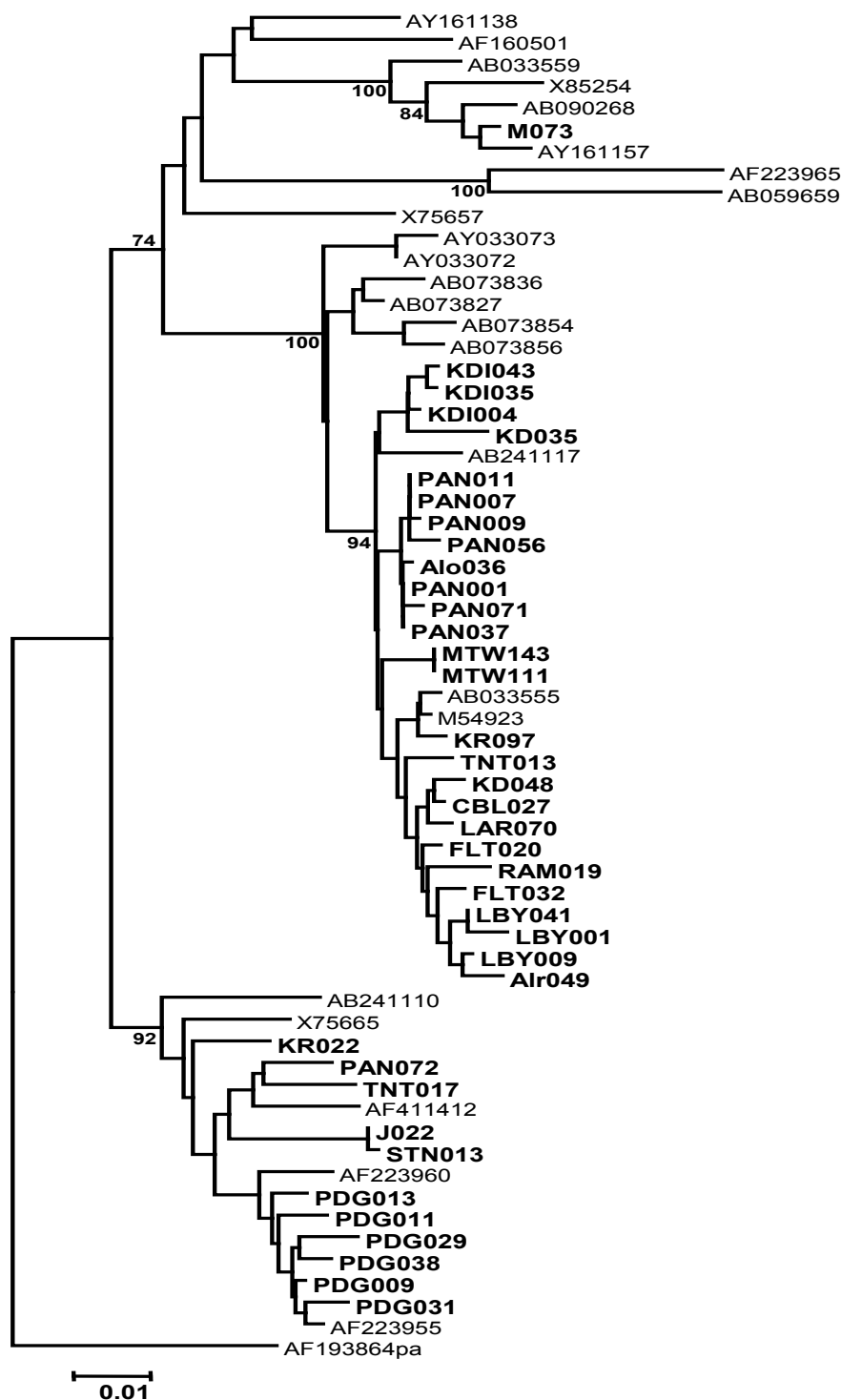
Dari 37 sampel VHB yang menunjukkan mutasi Q238H/N, terdapat 27 sampel dengan mutasi rtQ238H yang sebagian besar (26; 96,3%) sampel memiliki genotipe B dan hanya 1 sampel dengan genotipe C (Tabel 2). Pada 10 sampel lainnya dengan mutasi rtQ238N, sebanyak 9 (90%) sampel menunjukkan genotipe C dan 1 sampel dengan genotipe D. Pada penghitungan statistik yang menggunakan perangkat lunak SPSS 0 didapat bahwa mutasi rtQ238H berkorelasi dengan genotipe B ($p < 0,001$) dan mutasi rtQ238N berkorelasi dengan genotipe C ($p < 0,001$).

Klasifikasi Genotipe dan Subtipe

Semua sampel terdistribusi dalam kelompok genotipe pada pohon filogenetik dengan nilai *bootstrap* 74–100 yang menunjukkan pengelompokan genotipe sangat baik (Gambar 1). Sebanyak 26 (68,4%) sampel termasuk kelompok genotipe B, 11 (28,9%) isolat termasuk dalam genotipe C, dan 1 (2,6%) isolat masuk genotipe D. Sebaran subtipe sebanyak 25 (65,8%) sampel memiliki subtipe *ayw*, 11 (28,9%) sampel dengan subtipe *adr*, dan 2 (5,3%) sampel dengan subtipe *adw*.

Tabel 2. Sekuens Domain Reverse Transcriptase Gen Polimerase yang Berkaitan dengan Resistensi Nukleos(T)ida pada Seluruh Sampel dengan M54923 sebagai Sekuens Acuan

| No. | ID sampel | Genotipe | Subtipe | rtI169 | rtL180M | rtA181V/T | rtT184 | rtA194T | rtS202 | rtM204V/I/S | rtN236T | rtQ238H/N | rtM250V |
|-----|-----------|----------|------------|--------|---------|-----------|--------|---------|--------|-------------|---------|-----------|---------|
| | M54923 | B | <i>adw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | Q | M |
| 1 | Alo36 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 2 | Alr049 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 3 | CBL027 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 4 | FLT020 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 5 | FLT32 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 6 | J022 | C | <i>adr</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | N | M |
| 7 | KD048 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 8 | KD35 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | T | S | M | N | H | M |
| 9 | KDI04 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | T | S | M | N | H | M |
| 10 | KDI35 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | T | S | M | N | H | M |
| 11 | KDI43 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | T | S | M | N | H | M |
| 12 | KR-22 | C | <i>adr</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 13 | KR-97 | B | <i>adw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | Q | M |
| 14 | LAR070 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 15 | LBY009 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 16 | LBY01 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 17 | LBY041 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 18 | M73 | D | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | N | M |
| 19 | MTW111 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 20 | MTW143 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 21 | PDG11 | C | <i>adr</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | N | M |
| 22 | PDG13 | C | <i>adr</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | N | M |
| 23 | PDG29 | C | <i>adr</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | N | M |
| 24 | PDG38 | C | <i>adr</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | N | M |
| 25 | PDG31 | C | <i>adr</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | N | M |
| 26 | PDG9 | C | <i>adr</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 27 | PAN-71 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 28 | PAN-72 | C | <i>adr</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | N | M |
| 29 | PAN007 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 30 | PAN011 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 31 | PAN01 | B | <i>adw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 32 | PAN037 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 33 | PAN09 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 34 | PAN56 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 35 | RAM19 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 36 | STN013 | C | <i>adr</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | N | M |
| 37 | TNT13 | B | <i>ayw</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | H | M |
| 38 | TNT17 | C | <i>adr</i> | I | L | A | T | A | S | M | N | N | M |



Gambar 1. Pohon Filogenetik yang Dikonstruksi Berdasarkan Sekuens Gen Polimerase Sepanjang 797 Basa Menggunakan Piranti Lunak MEGA 4.1 dengan Parameter Kimura 2, *Neighbour-Joining*, dan Nilai *Bootstrap* 1000.

Pembahasan

Hingga saat ini, target pengobatan hepatitis B kronis adalah meminimalkan *viral load* sehingga dapat menekan progresivitas penyakit dan serokonversi HBsAg atau terbentuknya anti-HBs.

Beberapa studi menunjukkan korelasi antara *viral load* dan terjadinya *hepatocellular carcinoma* (HCC) dengan *viral load* 2,000 hingga 200,000 IU/mL sebagai tanda awal risiko peningkatan HCC.²⁸⁻

30

Kadar DNA VHB dalam serum merupakan faktor risiko *independent* untuk terjadinya sirosis dan HCC pada pasien dengan hepatitis B kronis.²⁹ Karena itu, pemeriksaan *viral load* merupakan hal penting karena dapat menjadi faktor prediksi untuk mengetahui risiko pasien terhadap terjadinya progresivitas penyakit. Sebaliknya, kadar DNA VHB yang rendah atau *undetectable* dengan pemberian NUCs berkorelasi dengan penurunan mortalitas dan/atau HCC.³¹⁻³³ Mutasi pada domain *reverse transcriptase* gen polimerase dapat mengakibatkan resistensi obat NUCs. Kasus mutasi pada domain ini sebagian besar dilaporkan dari pasien yang telah mendapat pengobatan jangka panjang dengan NUCs yang *less potent* dan memiliki *low genetic barrier* seperti LAM.³¹

Pada studi ini, didapat 10,8% sampel dengan mutasi rtA194T yang berkorelasi dengan resistensi NUCs walaupun subjek penelitian ini belum pernah mendapat terapi antiviral sebelumnya. Mutasi rtA194T yang ditemukan pada studi ini pernah dilaporkan berkaitan dengan resistensi LAM dan TDF pada pasien dengan koinfeksi HBV/HIV dan tanpa koinfeksi.^{23,34} Pada penelitian *in-vitro* ternyata mutasi rtA194T mengakibatkan kegagalan kemampuan replikasi virus sehingga diprediksi bahwa mutasi tersebut jarang ditemukan pada kasus klinis karena tidak mampu bertahan³⁵ walaupun mutasi tersebut pada penelitian ini ditemukan sebesar 10,8%. Persentase mutasi yang berkaitan dengan NUCs pada penderita yang belum mendapat pengobatan yang didapat pada penelitian ini lebih tinggi dari penelitian sebelumnya yang mendapat hasil hanya 1,2% dengan jumlah sampel yang besar.³⁶ Untuk mendapatkan data yang lebih baik maka diperlukan studi lanjutan dengan jumlah sampel yang lebih besar.

Walaupun mutasi pada domain *reverse transcriptase* banyak dilaporkan akibat pemberian NUCs jangka panjang, kemungkinan mutasi tersebut pada penderita yang belum mendapat terapi dapat terjadi. Hal tersebut disebabkan *error prone* selama replikasi sering kali terjadi dan variasi dinamika *viral load* dapat mengakibatkan akumulasi mutasi karena tekanan sistem imun pejamu yang sekaligus mengakibatkan polimorfisme genetik VHB.^{36,37} Interaksi antara sistem imun pejamu, VHB, dan obat/NUCs dapat mengakibatkan perubahan genetik/*genetic divergence* VHB sebagai mekanisme bertahan terhadap sistem imun pejamu sehingga mengakibatkan resistensi NUCs. Akumulasi kompleks antara interaksi VHB-sistem imun pejamu, faktor pejamu, faktor VHB, dan intervensi obat atau

tindakan tentu menentukan perjalanan penyakit hepatitis B kronis. Ditemukannya hampir 90% sampel tanpa mutasi yang berkaitan dengan resistensi NUCs memberikan informasi penting bahwa pasien dalam penelitian ini masih cukup sensitif terhadap pengobatan NUCs. Berdasarkan studi ini, terapi dengan NUCs masih sangat prospektif untuk diberikan di Indonesia bagi pasien yang belum mendapat pengobatan dengan catatan diterapkannya algoritme konsensus penggunaan NUCs yang disepakati.^{2,38}

Penelitian ini didominasi oleh sampel VHB dengan genotipe B dimana sebagian besar sampel (73,7%) berasal dari sekitar garis Wallacea sehingga studi ini sejalan dengan laporan sebelumnya bahwa daerah Wallacea didominasi oleh genotipe B dan sub tipe *ayw*.³⁹ Informasi mengenai genotipe memiliki arti prognosis karena berkaitan dengan respons terhadap pengobatan selain berkaitan dengan luaran klinis hepatitis B kronis. Dibandingkan dengan genotipe B, genotipe C banyak dikaitkan dengan sulitnya terjadi serokonversi HBeAg, perjalanan penyakit yang lebih buruk, tingginya *viral load*, dan tingginya prevalensi HCC.^{40,41} Demikian pula pada kasus kohort yang dilaporkan bahwa pasien dengan genotipe C perjalanan penyakitnya lebih progresif dibandingkan pasien dengan genotipe B⁴² namun, pada studi retrospektif genotipe B memiliki asosiasi terjadinya resistensi yang lebih awal dibandingkan genotipe C.⁴³ Sebanyak 37 (97,4%) sampel VHB menunjukkan mutasi pada posisi rtQ238H/N (rtQ238H sebanyak 73% dan rtQ238N sebanyak 27%) yang belum pernah dilaporkan. Bila dilihat lebih lanjut, ternyata mutasi rtQ238H berkorelasi dengan genotipe B ($p < 0,001$) dan mutasi rtQ238N berkorelasi dengan genotipe C ($p < 0,001$) sehingga dikatakan bahwa mutasi rtQ238H/N merupakan variasi genetik/varian yang berkaitan dengan genotipe.

Kesimpulan

Disimpulkan bahwa sebagian besar sampel masih sensitif terhadap NUCs walaupun ditemukan pula sampel dengan mutasi yang berkaitan dengan resistensi tenofovir. Mutasi rtQ238H/N yang ditemukan pada studi ini tidak berkaitan dengan resistensi NUCs tetapi merupakan varian yang berkaitan dengan genotipe VHB, dimana rtQ238H berkaitan dengan genotipe B dan rtQ238N berkaitan dengan genotipe C.

Ucapan terima kasih

Penelitian ini didukung oleh Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia melalui Program Insentif SINas.

Daftar Pustaka

1. WHO. Hepatitis B Fact Sheet no.204. 2017. Diunduh dari <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
2. Sarin SK, Kumar M, Lau GK, Abbas Z, Chan HL, Chen CJ, et al. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. *Hepatol Int*. 2016;10(1):1-98.
3. Khan M, Dong JJ, Acharya SK, Dhagwahdorj, Abbas Z, Jafri WSM, et al. Hepatology issues in Asia: perspectives from regional leaders. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004;19:S419-30.
4. Riset Kesehatan Dasar. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2007.
5. European Association for The Study of The Liver (EASL). EASL 2017 clinical practice guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2017. doi: 10.1016/j.jhep.2017.03.021
6. Terrault NA, Bzowej NH, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, Murad MH. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology* 2016;63:261-83.
7. Ghany MG, Doo EC. Antiviral resistance and hepatitis B therapy. *Hepatology*. 2009;49(Suppl 5):S174-84.
8. Van Bommel F, Bartens A, Mysickova A, Hofmann J, Krueger DH, Berg T, et al. Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors. *Hepatology*. 2015;61:66-76.
9. Huang YW, Chayama K, Kao JH, Yang SS. Detectability and clinical significance of serum hepatitis B virus ribonucleic acid. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2015;4:197-202.
10. Wang J, Shen T, Huang X, Kumar GR, Chen X, Zeng Z, et al. Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. *J Hepatol* 2016;65:700-10.
11. Alavian SM, Carman WF, Jazayeri SM. HBsAg variants: diagnostic-escape and diagnostic dilemma. *J Clin Virol* 2013;57:201-8.
12. Zhang QF, Shao JY, Yin WW, Xia Y, Chen L, Wang X, et al. Zhang DZ. Altered immune profiles of natural killer cells in chronic hepatitis B patients: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2016;11(8):e0160171.
13. Lin Z, Zhang J, Ma X, Yang S, Tian N, Lin X, et al. The role of interferon lambda 3 genetic polymorphism in response to interferon therapy in chronic hepatitis B patients: an updated meta-analysis. *Hepat Mon* 2016;16(7):e37534.
14. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*. 2000;81:67-74.
15. Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombination genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol*. 2008;82:5657-63.
16. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotype isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*. 2009;83:10538-47.
17. Su TH, Kao JH. Improving clinical outcomes of chronic hepatitis B virus infection. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;9:141-54.
18. Lai CL, Chien RN, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, et al. A one year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med*. 1998;339(2):61-8.
19. Chang TT, Gish RG, de Man R, Gadano A, Sollano J, Chao YC, et al. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med*. 2006;354(10):1001-10.
20. Yapali S, Talaat N, Lok AS. Management of hepatitis B: our practice and how it relates to the guidelines. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12:16-26.
21. Locarnini S, Hatzakis A, Chen DS, Lok A. Strategies to control hepatitis B: public policy, epidemiology, vaccine, and drugs. *J Hepatol*. 2015;62:S76-86.
22. Locarnini S, Bowden S. Drug resistance in antiviral therapy. *Clin Liver Dis*. 2010;14(3):439-59.
23. Tacke F, Kroy DC. Treatment for hepatitis B in patients with drug resistance. *Ann Transl Med*. 2016;4(18):334-40.
24. Lim YS. Management of antiviral resistance in chronic hepatitis B. *Gut and Liver*. 2017;11(2):189-95.
25. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007;24:1596-9.
26. Quarleri J, Moretti F, Bouzas MB, Laufer N, Carrillo MG, Giuliano SF, et al. Hepatitis B virus genotype distribution and its lamivudine-resistant mutants in HIV-coinfected patients with chronic and occult hepatitis B. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007;23(4):525-31.
27. Norder H, Hammas B, Lofdahl S, Courouce AM, Magnus LO. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol*. 1992;73(5):1202-8.
28. Liu CJ, Chen BF, Chen PJ, Lai MY, Huang WL, Kao JH, et al. Role of hepatitis B viral load and basal core promoter mutation in hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *J Infect Dis*. 2006;193(9):1258-65.
29. Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*. 2006;295(1):65-73.
30. Yuen MF, Tanaka Y, Fong DY, Fung J, Wong DK, Yuen JC, et al. Independent risk factors and predictive score for the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2009;50(1):80-8.

31. Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, Farrell G, Lee CZ, Yuen H, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med*. 2004;351(15):1521-31.
32. Yuen MF, Seto WK, Chow DH, Tsui K, Wong DK, Ngai VW, et al. Long-term lamivudine therapy reduces the risk of long-term complications of chronic hepatitis B infection even in patients without advanced disease. *Antivir Ther*. 2007;12(8):1295-303.
33. Wu CY, Lin JT, Ho HJ, Su CW, Lee TY, Wang SY, et al. Association of nucleos(t)ide analogue therapy with reduced risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B: a nationwide cohort study. *Gastroenterology*. 2014;147(1):143-51.
34. Sheldon J, Camino N, Rodés B, Bartholomeusz A, Kuiper M, Tacke F, et al. Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. *Antivir Ther*. 2005;10(6):727-34.
35. Amini-Bavil-Olyaei S, Herbers U, Sheldon J, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. The rtA194T polymerase mutation impacts viral replication and susceptibility to tenofovir in hepatitis B e antigen-positive and hepatitis B e antigen-negative hepatitis B virus strains. *Hepatology*. 2009;49(4):1158-65.
36. Lok AS, Ganova-Raeva L, Cloonan Y, Punkova L, Lin HS, Lee WM, et al. Hepatitis B Research Network (HBRN). Prevalence of hepatitis B antiviral drug resistance variants in North American patients with chronic hepatitis B not receiving antiviral treatment. *J Viral Hepat*. 2017. doi: 10.1111/jvh.12732
37. Huang CJ, Wu CF, Lan CY, Sung FY, Lin CL, Liu CJ, et al. Impact of genetic heterogeneity in polymerase of hepatitis B virus on dynamics of viral load and hepatitis B progression. *PLoS One* 2013;8(7):e70169.
38. Gani RA, Hasan I, Djumhana A, Setiawan PB. *Konsensus Nasional Penatalaksanaan Hepatitis B di Indonesia 2012*. Jakarta: Perhimpunan Peneliti Hati Indonesia; 2012.
39. Thedja MD, Muljono DH, Nurainy N, Sukowati CH, Verhoef J, Marzuki S. Ethnogeographical structure of hepatitis B virus genotype distribution in Indonesia and discovery of a new subgenotype, B9. *Arch Virol*. 2011;156(5):855-68.
40. Chan HL, Tsang SW, Liew CT, Tse CH, Wong ML, Ching JY, et al. Viral genotype and hepatitis B virus DNA levels are correlated with histological liver damage in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(2):406-12.
41. Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology*. 2002;122(7):1756-62.
42. Chan HLY, Wong ML, Hui AY, Hung LCT, Chan FKL, Sung JY. Hepatitis B virus genotype C take a more aggressive disease course than hepatitis B virus genotype B in hepatitis B e Antigen-positive patients. *J Clin Microbiol*. 2003;41(3):1277-19.
43. Lin CL, Kao JH. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(Suppl 1):123-30.